

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00965

Ang II 抑制剂对 HIF-1 α 在慢性肾衰大鼠肾组织中表达的影响

秦军燕¹, 王琛^{1,2*}, 杨婧¹, 邵命海¹, 留寅清¹, 何立群^{1,2}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肾内科, 上海 200021
2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 200021

[摘要] **目的** 观察 Ang II 抑制剂对于 5/6 (ablation/infarction, A/I) 肾切除慢性肾衰大鼠残余肾组织 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 表达的影响, 并初步探讨其作用机制。 **方法** 将 SD 雄性大鼠随机抽取 15 只设为假手术组 (A 组), 其余采用 5/6 (A/I) 肾切除慢性肾衰模型法制作成慢性肾功能衰竭动物模型, 随机分为模型组 (B 组) 和 Ang II 抑制剂 (氯沙坦钾合福辛普利钠) 组 (C 组), 每组 15 只, 分别给予相应干预, 60 d 后检测生化指标, 并采用蛋白质印迹法和荧光定量 PCR 分别测定大鼠残余肾皮质、髓质 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 的表达。 **结果** 模型组与假手术组比较, SCr、BUN 升高, CCr 降低 (P 均 < 0.01); Ang II 抑制剂组与模型组干预后比较, SCr、BUN 水平下降, CCr 水平升高 (P 均 < 0.05)。模型组大鼠肾皮质、髓质 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达均较假手术组升高 ($P < 0.05$), Ang II 抑制剂组 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 在肾皮质和髓质中的表达均较模型组减少 ($P < 0.05$)。 **结论** Ang II 抑制剂可以改善 5/6 (A/I) 肾切除慢性肾衰大鼠的肾功能, 其作用机制可能与 HIF-1 α 信号通路有关。

[关键词] 缺氧诱导因子 1, α 亚基; 肾纤维化; 肾功能衰竭; 血管紧张素 II; 缺氧

[中图分类号] R 692.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-0965-04

Effects of angiotensin II inhibitor on HIF-1 α expression in the renal tissue of 5/6th kidney ablation/infarction rats

QIN Jun-yan¹, WANG Chen^{1,2*}, YANG Jing¹, SHAO Ming-hai¹, LIU Yin-qing¹, HE Li-qun^{1,2}

1. Department of Nephrology, Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China
2. Shanghai Key Clinical Laboratory of TCM, Shanghai 200021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influences of Angiotensin II inhibitor on renal expression of HIF-1 α mRNA and protein in the chronic renal failure (CRF) rats (induced by 5/6th kidney ablation/infarction [5/6A/I]) and the related mechanism. **Methods** SD rats were made into CRF model by means of 5/6th kidney ablation/infarction. The study was divided into sham operation group (Group A), model group (Group B) and Angiotensin II inhibitor (Cozaar-with-Monopril) group (Group C), each group containing 15 rats. The biochemical parameters of the rats were examined 60 days later in the 3 groups. The expression of HIF-1 α mRNA and protein in the remnant renal cortex and medulla were assessed by Real-time PCR and Western blotting analysis. **Results** Compared with group A, group B had significantly increased SCr and BUN levels and significantly decreased CCr level ($P < 0.01$). Compared with group B, group C had significantly decreased SCr and BUN levels and significantly increased CCr level ($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α mRNA and protein in the renal cortex and medulla in group B was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$), and that in group C was significantly lower than that in group B ($P < 0.05$). **Conclusion** Angiotensin II inhibitor can improve the renal function in CRF rats induced by 5/6 (A/I), which might be associated with HIF-1 α signaling pathway.

[Key words] hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; renal fibrosis; kidney failure; angiotensin II; anoxia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):965-968]

肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 增多, 尤其是基质蛋白合成增加, 基质降解受抑制造成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的大量

[收稿日期] 2012-04-08 **[接受日期]** 2012-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金 (30973723), 上海市科委基金 (08411962400), 上海高校创新团队建设基金资助项目 (201203). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973723), Fund of Shanghai Science and Technology Committee (08411962400), and Fund for Building Innovation Team of Shanghai Higher Institutions (201203).

[作者简介] 秦军燕, 硕士生. E-mail: yanzi3414@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-53827368, E-mail: chenwang8@hotmail.com

堆积、肾小球硬化和小管间质的纤维化,导致组织结构的破坏和肾功能损害。近年来,大量临床和实验研究表明 RIF 是反映肾功能下降严重程度和判断预后的最重要指标^[1],在各种慢性肾脏疾病(CKD) 转归中起主导作用。因此深入研究 RIF 的机制尤为重要。

RIF 的发病是一个非常复杂的过程,受多种致病因素的相互作用,其中缺氧被认为是促进纤维化的重要因素之一^[2]。低氧诱导因子 1α (HIF- 1α) 是体现体内低氧的指标之一^[3],是参与缺氧诱导纤维化这一病理生理过程的关键细胞因子。但既往研究未涉及该过程中 HIF- 1α 的变化^[4-5]。本研究采用 5/6(ablation/infarction, A/I) 肾切除来制造肾脏纤维化动物模型,检测 5/6(A/I) 肾切除对 HIF- 1α 蛋白及 mRNA 表达的影响及 Ang II 抑制剂的干预作用,进一步探讨 Ang II 抑制剂保护肾脏的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 健康成年雄性 SD 大鼠[购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号:SCXK(沪)2008-0016,饲养于上海曙光医院实验动物 SPF 中心],8 周龄,体质量 190~210 g。在(22±2)℃,相对湿度(55±2)% 环境下饲养,饲料为市售固体饲料,饮用水均为自来水,自由饮水及摄食。TRIzol(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Promega 公司),实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),目的基因序列从美国国立生物技术信息中心(NCBI)获取,采用 oligo 和 primer 5 设计引物,设计好的引物由 Invitrogen 公司合成。氯沙坦钾(杭州默沙东制药有限公司,批号:H20030654);福辛普利钠(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:H19980197);蛋白质印迹分析所用试剂购于江苏碧云天生物技术研究;电泳及转膜装置(美国 Bio-Rad),兔抗大鼠一抗(美国 Abcom);辣根过氧化酶(HRP)标记二抗(美国 ICL Biotechnology)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验模型构建与分组 从健康成年雄性 SD 大鼠中随机抽取 15 只作为假手术组(A 组),其余的按 5/6(A/I)肾衰模型法制备肾衰大鼠模型^[6]:大鼠用 2%戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔注射麻醉,使之固定于恒温手术台上,局部备皮后常规消毒,在左侧肋弓下 0.5 cm、脊柱向左旁开 1 cm 处切开一垂直于脊柱、长约 2.5 cm 的切口。在无菌条件下经后腹膜暴露左肾,分离肾包膜后,将左肾动脉的 2/3 分支

结扎(后支及前降支单个结扎)并缝合,1 周后摘除右肾。4 周后大鼠尾静脉取血,用全自动生化分析仪(Beckman Coulter AU2700)测生化指标。大鼠血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)升高($P<0.01$),肌酐清除率(CCr)降低($P<0.01$)表示造模成功。造模成功后按肌酐组间无统计学差异将剩余大鼠随机分为模型组(B 组)、氯沙坦钾合福辛普利钠组(C 组),每组各 15 只。

1.2.2 干预方法 按照药物剂量为成人标准体质量(60 kg)常规用量的 20 倍灌胃, A 组和 B 组予纯净水 2 ml 灌胃模拟治疗,每日 1 次; D 组予氯沙坦钾合福辛普利钠混悬液 2 ml(5.5 mg/ml)灌胃,每日 1 次。60 d 为一个疗程。

1.2.3 样本采集与处理 大鼠用 2%戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔注射麻醉,打开腹腔,下腔静脉采血,4℃离心,收集血清。摘取肾脏,液氮处理后送至-80℃保存备用。

1.2.4 血清学指标测定 灌胃 60 d 后测定肾功能 BUN、SCr 及血红蛋白(Hb);用 CCr 代替肾小球滤过率(GFR): $CCr(\text{ml}/\text{min}) = \text{尿肌酐} \times 24 \text{ h 尿量}(\text{ml}) / \text{血清肌酐} \times 1.440$ 。

1.2.5 实时定量 PCR 检测 mRNA 的表达 用 TRIzol 法提取大鼠肾皮质和髓质 RNA,按反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA,通过实时定量 PCR 仪检测肾皮质和髓质 HIF- 1α mRNA 的表达。以 β -actin 为内参。大鼠 HIF- 1α 的扩增片段长度 149 bp,上游引物:5'-GCG AAG CAA AGA GTC TGA AG-3',下游引物:5'-CAA GAT CAC CAG CAC CTA GAA G-3'。 β -actin 扩增片段长度 155 bp,上游引物:5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3',下游引物:5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3'。反应条件:95℃ 变性 5 min;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。每个样本在 PCR 仪器中扩增需要 3 个复孔,ABI 实时荧光定量 PCR 仪监测记录数据,根据标准曲线由软件自动计算得出结果。

1.2.6 蛋白质印迹法测定 HIF- 1α 蛋白表达 将少量-80℃保存的新鲜肾组织块皮质和髓质分离后称重,加入 Western 及 IP 细胞裂解液,置于匀浆机中匀浆,使其充分裂解。然后在 4℃下 300×g 离心 10 min,取上清分装于 1.5 ml 离心管中。BCA 蛋白质定量试剂盒(江苏碧云天生物技术研究)测定蛋白浓度后制样备用。各组样本蛋白经凝胶电泳分离后转膜,脱脂牛奶室温封闭 1 h 后加一抗(1:2 000),

4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后用 HRP 标记二抗 1 : 6 000 进行杂交, ECL 发光, 暗室曝光。以 GAPDH 作为内参照, 结果用 ij140-jdk6 软件进行光密度分析。重复 3 批不同样本。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 生化指标检测 各组大鼠干预前后 SCr、BUN 及 CCr 的比较见表 1。与假手术组比较, 模型组 SCr、BUN 升高, CCr 降低(P 均 <0.01), 提示造模成功。与本组干预前比较, Ang II 抑制剂组 SCr、BUN 水平下降, CCr 水平升高(P 均 <0.01)。与模型组干预后比较, Ang II 抑制剂组 SCr、BUN 水平下降, CCr 水平升高(P 均 <0.05)。

表 1 各组大鼠干预前后 SCr、BUN 及 CCr 比较

Tab 1 Comparison of SCr, BUN and CCr levels before and after intervention in each group

$n=15, \bar{x} \pm s$

Group	SCr $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	BUN $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	CCr $(\text{ml} \cdot \text{min}^{-1})$
Before treatment			
A	37.2 \pm 5.7	6.0 \pm 1.6	1.7 \pm 0.7
B	77.7 \pm 5.5 $\Delta\Delta$	10.1 \pm 1.7 $\Delta\Delta$	0.6 \pm 0.1 $\Delta\Delta$
C	79.6 \pm 8.0	9.9 \pm 1.9	0.5 \pm 0.2
After treatment			
A	37.3 \pm 5.9	5.9 \pm 1.6	1.7 \pm 0.8
B	77.6 \pm 5.7 $\Delta\Delta$	10.6 \pm 1.4 $\Delta\Delta$	0.6 \pm 0.2 $\Delta\Delta$
C	70.5 \pm 5.3 $^{*}\blacktriangle$	9.1 \pm 1.4 $^{*}\blacktriangle$	0.7 \pm 0.2 $^{*}\blacktriangle$

A: Sham operation; B: Model group; C: Angiotensin II inhibitor group. SCr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen; CCr: Creatinine clearance rate. $^{*}P<0.01$ vs pre-intervention; $\Delta\Delta P<0.01$ vs group A at the same time point; $\blacktriangle P<0.05$ vs group B at the same time point

2.2 残余肾组织 HIF-1 α mRNA 表达的比较 模型组大鼠肾皮质、髓质 HIF-1 α 的表达均较假手术组升高($P<0.05$); 与模型组比较, Ang II 抑制剂组 HIF-1 α 在皮质和髓质中的表达均减少($P<0.05$)。见图 1。

2.3 残余肾组织 HIF-1 α 蛋白表达的比较 采用蛋白质印迹方法检测残余肾组织 HIF-1 α 蛋白的表达, 结果发现模型组的皮质和髓质 HIF-1 α 蛋白表达较假手术组增多($P<0.05$); Ang II 抑制剂组皮质和髓质 HIF-1 α 蛋白表达较模型组减少($P<0.05$)。见图 2。

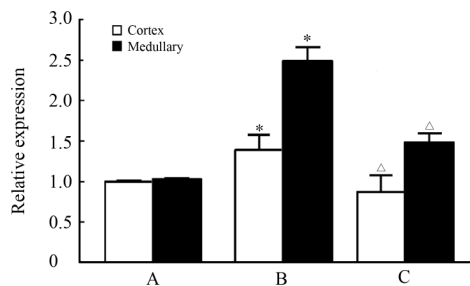


图 1 各组大鼠皮质、髓质

HIF-1 α mRNA 的表达(实时定量 PCR)

Fig 1 HIF-1 α mRNA expression in rat cortex, medullary as determined by real-time PCR

A: Sham operation group; B: Model group; C: Angiotensin II inhibitor group. $^{*}P<0.05$ vs group A; $\Delta P<0.05$ vs group B. $n=3, \bar{x} \pm s$

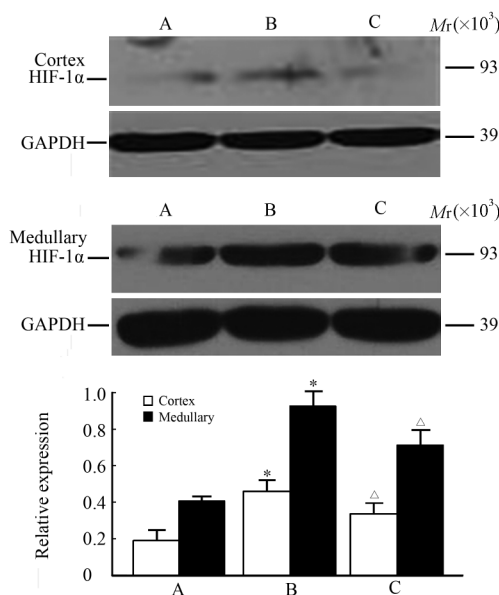


图 2 各组肾组织残余肾皮质、

髓质 HIF-1 α 的蛋白表达(蛋白质印迹法)

Fig 2 HIF-1 α protein expression in residual renal cortex, medullary as determined by Western blotting analysis

A: Sham operation group; B: Model group; C: Angiotensin II inhibitor group. $^{*}P<0.05$ vs group A; $\Delta P<0.05$ vs group B. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

RIF 是过度的组织修复过程, 几乎是所有肾脏疾病进展到终末期的共同途径和主要病理基础。目前对肾纤维化的研究是肾脏疾病领域研究的热点之一。本实验主要观察 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 在 5/6 (A/I) 肾切除慢性肾衰大鼠残余肾组织中的表达及 Ang II 抑制剂对其表达的影响, 研究发现, 模型组大鼠肾皮质、髓质 HIF-1 α mRNA 和蛋白的表达均较假手术组升高, Ang II 抑制剂组 HIF-1 α 在皮质和髓质中的表达均较模型组减少。

缺氧可诱导肾脏纤维化的发生、发展, 是促进肾

脏纤维化的重要因素之一。研究证实,肾小管周围毛细血管丢失等因素引起的缺氧是 RIF 进行性发展的重要原因^[7-8]。

1992年 Semenza^[9] 在人的 HEP3B 细胞株的核提取物中发现 HIF-1 蛋白质,此蛋白能特异性地结合于红细胞生成素(EPO)基因增强子的寡核苷酸序列。HIF-1 由 α 亚基和 β 亚基组成,其中 α 亚基是 HIF-1 的功能亚基。HIF-1 α 含有独特的氧依赖降解区,常氧下 HIF-1 α 蛋白易被泛素-蛋白酶体系统降解,几乎不发生表达。因此,HIF-1 α 表达升高可以间接说明缺氧的存在^[10]。HIF-1 α 是迄今为止发现的唯一一个在缺氧状态下发挥活性的特异性转录因子,是专一调节氧稳态的关键介质。近年许多研究表明,缺氧可以通过改变细胞的氧化还原状态来减少活性氧的生成,从而激活胞浆内 HIF-1 α , HIF-1 α 由胞浆进入胞核内与靶基因结合,形成转录起始复合物,启动靶基因的转录^[11]。HIF-1 α 参与炎症、肿瘤、细胞代谢等与缺氧有关的一系列病理生理过程^[12]。进一步研究发现,缺氧引起 HIF-1 α 转录因子活化,从而诱导血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子 β (PGDF- β)等基因的表达,促进纤维化的发生。此外,Fine等^[13]和 Higgins等^[14]认为 HIF-1 α 在缺氧诱导成纤维细胞和肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞的过程中起重要作用。既往研究发现,血管紧张素 II (Ang II) 可以使血管平滑肌细胞内 HIF-1 α 的表达增加。Ang II 可能是通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)依赖的磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)途径激活 HIF-1 α , 其作用位点可能是在 HIF-1 α mRNA 的 5'非编码链区域(UTR)^[15]。

我们前期的研究证实,5/6(A/I)肾衰模型可以导致肾内缺氧^[4],结合本研究结果,我们认为肾组织缺氧可以诱导 HIF-1 α 转录因子活化,进而促进 RIF 的发生。本研究发现,Ang II 抑制剂可能是通过 HIF-1 α 信号通路调节肾组织缺氧与细胞能量代谢,从而减轻肾纤维化的作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 周燕,孙子林,周莉,翟清.糖基化终产物对人肾小管上皮细胞 Fractalkine 表达的影响[J].医学研究生学报,2010,23:1042-1047.
- [2] Klahr S. Obstructive nephropathy[J]. Intern Med, 2000, 39: 355-361.
- [3] Norman J T, Clark I M, Garcia P L. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts[J]. Kidney Int, 2000, 58: 2351-2366.
- [4] 杨婧,王琛,邵命海,秦军燕,吴笛,李睿琳,等.肾衰 II 号方对 5/6 肾切除大鼠肾血流量和肾内氧耗影响及其作用机制[J].中国中西医结合肾病杂志 2011,12:578-581.
- [5] 蒲冠军,王琛,郑平东,何立群.肾衰 2 号方对慢性肾衰大鼠肾皮质环氧化酶 2 及环氧化酶 1 mRNA 表达的影响[J].中西医结合学报,2009,7:1067-1072.
- [6] Deng A, Tang T, Singh P, Wang C, Satriano J, Thomson S C, et al. Regulation of oxygen utilization by angiotensin II in chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2009, 75:197-204.
- [7] 冯英,谌贻璞,程虹,高艳丽,董鸿瑞,胡昭.慢性马兜铃酸肾病血小板反应因子 1 高表达与肾间质纤维化及微血管丢失的关系[J].中华肾脏病杂志,2006,22:221-225.
- [8] 孙东,冯江敏,戴春,孙立,金毅,王宗谦,等.管周毛细血管损害引起的低氧对大鼠慢性马兜铃酸肾病进展的影响[J].中华医学杂志,2006,86:1464-1469.
- [9] Semenza G L. Perspectives on oxygen sensing[J]. Cell, 1999, 98:281-284.
- [10] 邓毅恒,窦科峰,张色华,张福琴,李俊杰.缺氧在大鼠肝纤维化形成中的作用机制[J].西安交通大学学报(医学版),2011,32:215-219.
- [11] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor-1[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6):993-998.
- [12] Fedele A O, Whitelaw M L, Peet D J. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors[J]. Mol Interv, 2002, 2:229-243.
- [13] Fine L G, Norman J T. The breathing kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13:1974-1976.
- [14] Higgins D F, Kimura K, Bernhardt W M, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2007, 117:3810-3820.
- [15] Pagé E L, Robitaille G A, Pouyssegur J, Richard D E. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms[J]. J Biol Chem, 2002, 277:48403-48409.

[本文编辑] 徐佳,孙岩